

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17487

研究課題名(和文) 肝プロスタシンを起点とした個体レベルにおける新たな糖・脂質代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) Liver-Specific Overexpression of Prostasin Attenuates High-Fat Diet-Induced Metabolic Dysregulation in Mice

研究代表者

関根 哲生 (SEKINE, TETSUO)

山梨大学・大学院総合研究部・臨床助教

研究者番号：70835975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：世界的な健康課題である糖・脂質代謝異常において、肝臓は重要な役割を担っている。セリンプロテアーゼの1つであるプロスタシンは、機能喪失の実験系においてトール様受容体4を切断し肝臓におけるインスリン感受性を調節する。しかし、プロスタシン機能獲得の実験系における糖・脂質代謝への影響は未解明である。研究代表者は、高脂肪食給餌下肝細胞特異的プロスタシン過剰発現マウスは体重非依存的な糖代謝・脂肪肝の改善を示した。プロスタシンはマトリックスメタロプロテアーゼ14の活性化を介し細胞外シグナル調節キナーゼのリン酸化を亢進させた。以上は、プロスタシン機能獲得の実験系における糖・脂質代謝調節機構の解明につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満の増加に伴う糖・脂質代謝異常は世界的な健康課題であり、その機序解明は予防・治療・創薬の観点から重要である。プロスタシンの機能喪失の実験系において、プロスタシンはインスリン感受性に関与することが示されていたが、プロスタシンの臨床応用を考慮するにはプロスタシン機能獲得の実験系における検証や分子機序の解明が必要となる。今回、肝細胞特異的プロスタシン過剰発現マウスを作成し、プロスタシン機能獲得の実験系における糖・脂質代謝への影響を検証し、その分子機序を明らかにしたことは今後の糖・脂質代謝疾患の予防・治療・創薬の分野において重要な成果と考える。

研究成果の概要(英文)：The liver has a most indispensable role in glucose and lipid metabolism where we see some of the most serious worldwide health problems. The serine protease prostasin (PRSS8) cleaves toll-like receptor 4 (TLR4) and regulates hepatic insulin sensitivity under PRSS8 knockout condition. However, liver substrate proteins of PRSS8 other than TLR4 and the effect to glucose and lipid metabolism remain unclarified with hepatic elevation of PRSS8 expression. Here we show that high fat-diet-fed liver-specific PRSS8 transgenic mice improved glucose tolerance and hepatic steatosis independent of body weight. PRSS8 amplified extracellular signal-regulated kinase phosphorylation associated with matrix metalloproteinase 14 activation in vivo and in vitro. These results identify the regulatory mechanisms of PRSS8 overexpression over glucose and lipid metabolism, as well as excessive hepatic fat storage.

研究分野：代謝および内分泌学

キーワード：糖尿病 脂肪肝 セリンプロテアーゼ マトリックスメタロプロテアーゼ14 細胞外シグナル調節キナーゼ プロスタシン 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満人口の増加と、それに伴う糖・脂質代謝異常は世界的な健康課題である。肝臓は糖・脂質代謝の中心的役割を担っているが、肥満に伴う肝臓への脂肪蓄積とインスリン抵抗性は糖・脂質代謝異常における重要な病態基盤である。これまでに、肝臓と糖・脂質代謝及び肥満が及ぼす影響について多くの研究がなされ、数多くの分子や調節機構に関する知見が得られている。プロスタシン(prostasin: PRSS8)は細胞膜に局在するセリンプロテアーゼで、膜蛋白の切断を介し機能調節を担う。研究代表者の研究室では、肝細胞特異的 PRSS8 欠損(liver-specific PRSS8knock-out: LK0)マウスの解析から肝 PRSS8 は Toll 様受容体(Toll-like receptor: TLR)4 を切断し、リポ多糖や飽和脂肪酸などにより惹起される肝臓の炎症を抑制していることを示した。また、高脂肪食や肥満では小胞体ストレスを介して肝 PRSS8 の発現が低下し、PRSS8 による炎症防御機構の破綻をきたしてインスリン抵抗性へ進展することを明らかにした(Nat Commun. 2014)。

(2) LK0 マウスの検討より、肝 PRSS8 の発現増加がインスリン抵抗性を改善する可能性が示唆され、PRSS8 の発現または活性の薬理的制御による糖代謝異常に対する治療法の創出が期待される。しかし、TLR4 以外の肝 PRSS8 基質蛋白は未同定で、特に肥満に伴う脂肪肝、および脂質代謝異常に關与する分子との相互作用は未検討である。また、慢性的に肝 PRSS8 が増加した際の糖・脂質代謝への影響も明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝 PRSS8 の新規基質蛋白を同定し、新たな糖・脂質代謝調節機構を明らかにすることである。LK0 マウスは野生型(wild type: WT)マウスと比較して、高脂肪食給餌下において、インスリン抵抗性と耐糖能異常が増悪し、Lipopolysaccharide 投与下において肝障害が増悪した(Nat Commun. 2014)。肝 PRSS8 機能獲得の実験系における糖・脂質代謝への影響とその分子機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *in vivo*において、肝 PRSS8 の個体レベルでの糖・脂質代謝への寄与を解明

高脂肪食(high-fat diet: HFD)給餌下 WT マウス及び肝細胞特異的 PRSS8 過剰発現(liverspecificPRSS8 transgenic: LTg)マウスの体重、血糖値、血清脂質を経時的に測定し、耐糖能・糖新生の評価のためブドウ糖負荷試験、ピルビン酸負荷試験を施行する。加えて、血液、肝臓を採取し、糖・脂質代謝関連遺伝子及び蛋白発現を解析する。

(2) *in vitro*において、糖・脂質代謝調節機構に關与する候補蛋白の同定及び、細胞レベルでの糖・脂質代謝調節機構の解明

肝 PRSS8 新規基質蛋白の候補を探索するため、テトラサイクリン(Tc)発現誘導システムを用いた誘導的 PRSS8 過剰発現ヒト肝(Tet-on HepG2)細胞を用いて、新規基質候補蛋白の下流分子やシグナルについて、その蛋白発現やリン酸化、mRNA 発現を検討し、機序を解明する。

4. 研究成果

(1) HFD 給餌下 LTg マウスは体重非依存的な糖代謝異常の改善を示した

研究代表者の研究室では LTg マウスを独自に作成し、解析を進めた。LTg マウスは HFD 給餌下において、WT マウスと比較して体重の変化に違いはないものの、空腹時血糖は有意に改善し、ブドウ糖負荷試験、ピルビン酸負荷試験ではインスリン抵抗性、糖新生能の有意な改善を認めた。インスリンシグナルにおいて重要なリン酸化 Akt のウェスタンプロットでは LTg マウスにおいて有意に亢進していた。

(2) HFD 給餌下 LTg マウスは脂肪肝の改善を示した

LTg マウスは HFD 給餌下において、WT マウスと比較して、血清コレステロール値、遊離脂肪酸が有意に低下していた。加えて、肝臓への脂肪蓄積も LTg マウスにおいて改善した。RT-PCR の解析では、*Cidea*, *Cidec*, *I11b*, *Col1a1* の有意な低下、*Fgf21* の有意な増加を認めた。

(3) Tet-on HepG2 細胞において PRSS8 はマトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase: MMP)14 の活性化と関連したリン酸化分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼ(extracellular signal-regulated kinase: ERK)の亢進を認めた

肝 PRSS8 新規基質蛋白の候補を探索するため、Tc 発現誘導システムを用いた Tet-on HepG2 細胞株を樹立した。LK0 マウスの検討では、PRSS8 による TLR4 の発現調節により糖代謝が調節されていることを明らかにした。一方で、LTg マウスや Tet-on HepG2 細胞では TLR4 の発現量に変化を認めず、PRSS8 機能獲得の実験系においては、TLR4 以外の肝 PRSS8 新規基質蛋白を介して、糖・脂質代謝が改善していることが示唆された。研究代表者は、LTg マウスの表現型を呈した機序として MMP14 に着目した。MMP14 は非活性型の全長 MMP14 として発現し、セリンプロテアーゼの 1 つである Furin により切断されることで活性型 MMP14 となることが知られているが、Furin

非依存的なプロテアーゼによる切断によっても活性型 MMP14 となることが報告されているが、そのプロテアーゼは未同定である。MMP14 は肝線維化を改善することが報告されており、Tet-on HepG2 細胞において、PRSS8 過剰発現により MMP14 の活性が亢進していた。MMP14 は、肝組織の再生に関与している Integrin subunit beta 1(ITGB1)の発現を正に制御することが知られているが、PRSS8 過剰発現により ITGB1 の発現も亢進していた。PRSS8 や ITGB1 は上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ(epidermal growth factor receptor: EGFR)のリン酸化を亢進させることは報告されているが、Tet-on HepG2 細胞においてもリン酸化 EGFR の亢進を認めた。リン酸化 EGFR は ERK のリン酸化を亢進させる。ERK は肝臓への脂肪蓄積の改善やインスリン感受性に関与している報告もあり、いずれも LTg マウスの表現型と合致し、Tet-on HepG2 細胞においてもリン酸化 ERK の亢進を認めた。以上より、MMP14-ITGB1-EGFR-ERK のカスケードに PRSS8 がクロストークしている可能性が示唆された。

(4) HFD 給餌下 LTg マウスは MMP14 の活性増加とリン酸化 ERK の亢進を示した

前述の MMP14-ITGB1-EGFR-ERK のカスケードについて、LTg マウスにおいて検討を行ったところ、MMP14 活性の増加とリン酸化 EGFR, ERK の亢進を認めた。LKO マウスにおいても同様の検討を行ったところ、MMP14 活性の低下と ITGB1 の発現低下、リン酸化 EGFR, ERK の低下を認めた。以上より、*in vitro*における検討で得られた知見と同様の傾向が *in vivo*における検討でも得られた。つまり、PRSS8 機能獲得の実験系においては、PRSS8 が MMP14-ITGB1-EGFR-ERK のカスケードにクロストークすることで、糖・脂質代謝を調節している可能性が示唆された(図1)。

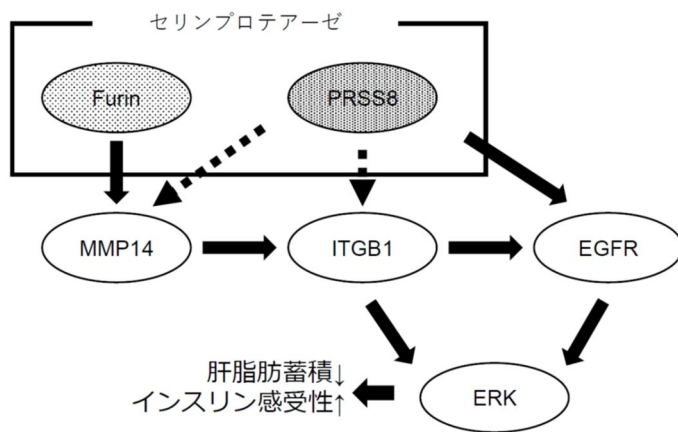


図1：カスケード模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tetsuo Sekine, Soichi Takizawa, Kohei Uchimura, Asako Miyazaki, Kyoichiro Tsuchiya	4. 巻 22(15)
2. 論文標題 Liver-Specific Overexpression of Prostatic Attenuates High-Fat Diet-Induced Metabolic Dysregulation in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22158314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関根哲生、土屋恭一郎、小林秀俊、滝澤壮一、古屋文彦
2. 発表標題 肝プロスタチンを起点とした 個体レベルにおける 新たな糖・脂質代謝調節機構の解明
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------